

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/04294 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/12,
C07K 14/435, C12N 15/63, C07H 21/00, A61K 38/17,
A61P 31/00

Montpellier (FR). HUBERT, Florence [FR/FR]; Rési-
dence Le Gauguin, B3-333, 75, Avenue du Pont Trinquat,
F-34000 Montpellier (FR). NOEL, Thierry [FR/FR]; 8,
rue Yves Montand, F-34830 Clapiers (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01975

(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;
Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 7 juillet 2000 (07.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:

99/08858

8 juillet 1999 (08.07.1999) FR

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ROCH,
Philippe [FR/FR]; 113, rue du Fesquet A1, F-34080 Mont-
pellier (FR). MITTA, Guillaume [FR/FR]; Résidence
Le Maurétania N° 10, Impasse Georges Costes, F-34000

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/04294 A1

(54) Title: ANTIMICROBIAL PEPTIDES DERIVED FROM MOLLUSCS

(54) Titre: PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE MOLLUSQUES

(57) Abstract: The invention concerns an antimicrobial peptide, called myticin, characterised in that it can be obtained from a bivalve mollusc shellfish, and its molecular mass is about 4.5 kDa; its pI is about 8.7; it comprises 8 cystein radicals. The invention also concerns its preparation and its uses. The invention further concerns a nucleic acid coding for said peptide.

(57) Abrégé: Peptide anti-microbien, dénommé myticine, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir d'un mol-
lusque bivalve, et en ce que sa masse moléculaire est d'environ 4,5 kDa; son pI est d'environ 8,7; il comprend 8 résidus cystéine,
son procédé de préparation et ses applications. Acide nucléique codant pour ledit peptide.

PEPTIDES ANTI-MICROBIENS DE MOLLUSQUES.

L'Invention est relative à de nouveaux peptides anti-microbiens produits par des mollusques.

Des polypeptides dotés de propriétés anti-microbiennes sont produits par une grande variété d'espèces (animales ou végétales), chez lesquelles ils participent à des mécanismes non-spécifiques de défense contre les infections.

Dans le cas des mollusques bivalves, on a jusqu'à présent identifié chez *Mytilus galloprovincialis*, un peptide dénommé MGD-1, apparenté aux défensines d'insectes [HUBERT et al., Eur. J. Biochem., 240, 302-306, (1996)] ; des peptides de la famille des défensines ont également été mis en évidence chez *Mytilus edulis*, ainsi que des peptides dénommés « mytilines » [CHARLET et al., J. Biol. Chem., 271, 21808-21813, (1996)] ;.

Les Inventeurs ont maintenant mis en évidence de nouveaux peptides anti-microbiens produits par *Mytilus galloprovincialis*, qui sont différents des défensines MGD1, et des Mytilines précédemment connues.

La présente invention a pour objet des peptides anti-microbiens, dénommés ci-après : « myticines » qui possèdent les caractéristiques suivantes :

- leur masse moléculaire est d'environ 4,5 kDa ;
- leur pI est d'environ 8,7 ;
- ils comprennent 8 résidus cystéine.

Selon un mode de réalisation préféré d'un peptide anti-microbien conforme à l'invention, il comprend la séquence (I) suivante (code 1 lettre) :

HX₁HX₂CTS₃YX₃CX₄KFCGTAX₅CTX₆YX₇CRX₈LHX₉GKX₁₀CX₁₁CX₁₂HCSR (I)

dans laquelle : X₁= P ou S, X₂= V ou A, X₃= Y ou W, X₄= S ou G, X₅= S ou G, X₆= R ou H, X₇= G ou L, X₈= N ou V, X₉= R ou P, X₁₀= L ou M, X₁₁= F ou A, X₁₂= L ou H.

Avantageusement, un peptide conforme à l'invention comprend l'une des séquences (Ia) ou (Ib) suivantes (code 1 lettre) :

5 HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRVLHPGKMCACVHCSR (Ia)
HPHVCTSYCYCSKFCGTAGCTRYGCRNLHRGKLCFCLHCSR (Ib)

Les séquences (Ia) et (Ib) représentent les formes matures, isolées à partir de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis*, de 2 Myticines dénommées Myticine a et Myticine b, dont les ADNc ont également été
10 clonés par les Inventeurs. A titre d'illustration de l'objet de la présente invention, les caractéristiques des Myticines a et b sont plus spécifiquement indiquées ci-après.

La séquence d'ADNc et la séquence
15 polypeptidique de la Myticine a sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO: 2. La séquence d'ADNc et la séquence polypeptidique de la Myticine b, sont représentées dans la liste de séquences en annexe sous
20 les numéros SEQ ID NO: 3 et SEQ ID NO: 4.

Le peptide actif de 40 acides aminés, correspondant à la séquence (I), et plus particulièrement à l'une des séquences (Ia) et (Ib) est flanqué d'une séquence signal de 20 acides aminés, et d'un peptide C-
25 terminal de 36 acides aminés. La séquence signal permettrait l'adressage du produit de traduction vers le réticulum endoplasmique. Le peptide C-terminal permettrait ensuite l'adressage vers les granules cytoplasmiques dans lesquels les Myticines sont stockées
30 sous forme mature et/ou la protection de la cellule contre une éventuelle activité cytolytique du peptide mature.

La masse moléculaire de la forme mature de la Myticine a est de 4438 Da ; la masse moléculaire de la
35 forme mature de la Myticine b est de 4562 Da.

Les Myticines ne présentent aucune homologie significative avec les peptides anti-microbiens connus dans l'art antérieur, et définissent un nouveau groupe de peptides anti-microbiens.

5 Les Myticines peuvent être obtenues par extraction à partir des mollusques qui les produisent, ou bien par synthèse peptidique, ou, avantageusement, par génie génétique, en exprimant au moins une séquence d'acide nucléique codant une Myticine, dans une cellule
10 hôte appropriée.

La présente Invention englobe également des acides nucléiques comprenant une séquence codant une Myticine, tel que définie ci-dessus.

Des acides nucléiques conformes à l'invention,
15 peuvent être obtenus par criblage de banques d'acide nucléique à l'aide d'oligonucléotides dérivés des séquences SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3, ou de leurs séquences complémentaires. Les oligonucléotides utilisables dans ce but font également partie de l'objet
20 de la présente invention ; avantageusement, ces oligonucléotides comprennent au moins 15 pb, et de préférence au moins 20 pb, de la portion codante de l'une des séquences SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3, ou de son complémentaire.

25 Les acides nucléiques conformes à l'invention englobent également les cassettes d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique codant une Myticine, placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

30 Par « promoteur approprié » on entend tout promoteur fonctionnel dans la cellule-hôte destinée à héberger la cassette d'expression. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur inductible ; il peut également s'agir, dans le cas où la cassette est
35 destinée à l'expression d'une Myticine chez un animal ou une plante, d'un promoteur tissu-spécifique.

Une cassette d'expression conforme à l'invention peut comprendre également au moins une séquence codant une séquence d'adressage appropriée ; ladite séquence d'adressage peut être choisie parmi
5 celles qui sont naturellement associées aux Myticines, telles que les séquences signal et/ou les séquences C-terminales associées aux isoformes Myticine a et Myticine b décrites ci-dessus ; il est également possible de choisir une ou plusieurs séquences d'adressage
10 hétérologues, fonctionnelles dans une cellule-hôte donnée : il peut s'agir notamment de séquences permettant l'adressage d'une Myticine vers un compartiment cellulaire déterminé, ou sa sécrétion dans le milieu de culture.

15 L'Invention a également pour objet :

- des vecteurs recombinants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention, codant une Myticine, et en particulier des vecteurs comprenant une cassette
20 d'expression telle que définie ci-dessus.

- des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention. Il peut s'agir de cellules en culture, ou de cellules faisant partie d'un organisme
25 pluricellulaire, animal ou plante. La séquence d'acide nucléique conforme à l'invention présente dans une cellule transformée peut être soit incorporée dans l'ADN chromosomique de ladite cellule, soit être portée par un vecteur extra-chromosomique.

30 L'invention a également pour objet un procédé de production d'une Myticine, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression de ladite Myticine, dans au moins une cellule transformée conforme à l'invention.

Les Myticines conformes à l'invention peuvent
35 être exprimées dans des cultures de cellules transformées en utilisant des techniques similaires à celles utilisées

pour des peptides antimicrobiens de l'art antérieur, par exemple dans des cellules d'insecte, comme décrit par HELLERS et al. [Eur. J. Biochem. 199, pp. 435-439, (1991)] pour les cécropines, ou dans la levure, comme
5 décrit par REICHHART et al. [Invertebrate Reproduction and Development, 21, pp. 15-24, (1992)].

Elles peuvent également être exprimées dans des animaux ou des plantes transgéniques, pour augmenter la résistance de ceux-ci aux infections, comme décrit par
10 exemple par JAYNES et al., [Plant Science, 89, pp. 43-53 (1993)] dans le cas de peptides analogues de la cécropine B, exprimés dans des plants de tabac transgénique, ou par NORELLI et al. [Euphytica, 77, pp. 123-128 (1994)] pour des plants de pommiers transgéniques exprimant le gène de
15 l'attacine-E.

Les Myticines sont utilisables en particulier pour l'obtention de produits et en particulier de médicaments anti-infectieux, par exemple anti-bactériens ou fongicides.

20 De tels produits trouvent leur application pour la prévention et le traitement de différentes maladies microbiennes, dans des secteurs très variés, en particulier dans les domaines de la santé et de l'agriculture, et dans celui de l'aquaculture, pour
25 limiter le développement de maladies infectieuses dans les élevages.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de purification et de
30 caractérisation des Myticines.

EXEMPLE 1 : ISOLATION DE PEPTIDES ANTI-MICROBIENS A PARTIR DE L'HEMOLYPHE DE MYTILUS GALLOPROVINCIALIS.

Préparation des fractions de l'hémolymph

Une réaction immunitaire est induite chez des
35 moules (*Mytilus galloprovincialis*) adultes selon le protocole suivant : la coquille est vidée de son liquide,

et 100 µl d'une suspension de bactéries (10^9 bactéries/ml) ou de champignons (suspension d'hyphes à 1 DO à 600nm), préalablement tués par la chaleur sont injectés dans le muscle adducteur. L'hémolymphe (approximativement 0,5 ml/animal) est prélevée à partir du muscle postérieur adducteur à l'aide d'une seringue en présence de 1 volume de tampon anti-agrégant MAS (Modified Alsevier Solution) et centrifugée immédiatement à 800g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction plasmatique, est additionné d'aprotinine (5µg/ml) et congelé (-80°C) jusqu'à utilisation, et le culot cellulaire est séché et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

Purification des Myticines.

Fraction plasmatique : Le plasma est dilué (1:1 v/v) dans de l'eau stérilisée par ultrafiltration (MilliQ) additionnée de 0,1% d'acide trifluoroacétique. Le pH est amené à 3,9 par addition d'HCl 1M, sous agitation dans un bain-marie glacé pendant 30 min. Après centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) le surnageant est recueilli et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation.

Hémocytes : Après décongélation le culot d'hémocytes est resuspendu dans 5 volumes de tampon Tris 50 mM, pH 8.7, contenant 50mM NaCl, et homogénéisé. Après centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C), le culot contenant les organites cellulaires est repris dans 3 volumes d'acide acétique 2 M, et traité par sonication (3 X 30s) dans un bain-marie glacé. Après élimination des débris par centrifugation (10000 g, 20 min, 4°C) l'extrait acide est conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

Purification HPLC

La fraction plasmatique ou les extraits acides d'hémocytes sont déposés sur des colonnes SEP-PAK C18 VAC (WATERS ASSOCIATES) pré-équilibrées par de l'eau acidifiée (0,05% acide trifluoroacétique). Après lavage à l'eau acidifiée, on effectue 2 éluations successives par des solutions d'acétonitrile à 10% et 40% dans de l'eau

acidifiée (0,05% acide trifluoroacétique). Les fractions obtenues sont lyophilisées et reconstituées avec de l'eau ultrafiltrée avant d'être soumises à une chromatographie HPLC en phase inverse.

5 Toutes les étapes de purification HPLC ont été effectuées sur un système HPLC BECKMAN GOLD HPLC équipé d'un détecteur BECKMAN 168. L'élution est suivie par mesure de l'absorption UV à 225 nm.

10 Etape 1: les fractions éluées sur SEP-PAK à 40% d'acétonitrile sont déposées sur une colonne HPLC phase inverse SEPHASIL C18 (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA). L'élution est effectuée par un gradient linéaire de 5 à 50% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée, pendant 90 min à un débit de 0,9 ml/min. Les fractions correspondant aux
15 pics d'absorbance sont collectées dans des tubes de polypropylène (MICROSORB 75 X 12 mm, NUNC IMMUNOTUBES), séchées sous vide, et reconstituées avec de l'eau ultrafiltrée, préalablement au test de leur activité antimicrobienne.

20 Etape 2: Les fractions actives récupérées à l'issue de l'étape 1 sont déposées sur une colonne HPLC phase inverse SEPHASIL C8 (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA). L'élution est effectuée, à un débit de 0,9 ml/min, par un gradient linéaire de 20 à 30% d'acétonitrile dans l'eau
25 acidifiée pendant 40 min.

30 Etape 3: Les fractions actives récupérées à l'issue de l'étape 2, sont déposées sur une colonne SEPHASIL C18, (250 mm X 4,1 mm) (PHARMACIA) en utilisant le gradient biphasique décrit dans l'étape 2, à un débit
30 de 0,9 ml/min.

35 Etape 4: La dernière étape de purification est effectuée sur une colonne phase inverse DELTA PAK HPI C18 (2 X 150 mm) (WATERS ASSOCIATES) en utilisant le gradient biphasique décrit dans l'étape 2, à un débit de
35 0,3 ml/min.

EXEMPLE 2 : ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES PEPTIDES OBTENUS**Micro-organismes utilisés:**

La liste des micro-organismes utilisés pour déterminer les activités anti-microbiennes de la Myticine a et de la Myticine b est indiquée ci-après, dans le Tableau 1

Essais antibactériens et détermination de la CMB:

La concentration minimale bactéricide (CMB) des peptides a été déterminée selon le protocole décrit par HANCOCK et al. [<http://www.interchg.ubc.ca/bobh/methods.htm>].

On effectue une série de dilutions successives au 1/2 des peptides dans une solution aqueuse contenant 0,01% d'acide acétique et 0,2% de sérum albumine bovine (BSA).

Des aliquotes de 10 µl de chaque dilution sont incubées dans des plaques stériles de microtitration en polypropylène à 96 puits, en présence de 100 µl de suspension bactérienne à une densité optique de départ $A_{600} = 0,001$ dans du milieu liquide MUELLER HINTON BROTH. L'incubation est effectuée pendant 18 h à 37°C sous agitation, sauf dans le cas des bactéries marines, pour lesquelles l'incubation est effectuée à 25°C. La CMB est déterminée en étalant sur milieu solide MUELLER HINTON AGAR le contenu des puits correspondant aux 3 premières dilutions pour lesquelles on n'observe aucune croissance bactérienne, et en incubant à 37°C pendant 18 heures. La plus faible concentration de peptide qui prévient toute formation résiduelle de colonies correspond à la CMB.

Activité antifongique :

L'activité antifongique a été déterminée par calcul de la CMI (concentration minimale inhibitrice) dans un test d'inhibition de croissance de *Fusarium oxysporum* en phase liquide, selon le protocole décrit par FELHBAUM et al [J. Biol. Chem., 269:33159-63, (1994)].

On effectue une série de dilutions successives au 1/2 des peptides, comme indiqué ci-dessus pour la détermination de l'activité antibactérienne.

80µl de spores suspendues (concentration finale, 10^4 spores/ml) dans du milieu « Potato Dextrose Broth » (DIFCO) sont ajoutés à 10µl de solution de peptide dans des plaques stériles de microtitration en polypropylène à 96 puits. Le volume final est ajusté à 100µl par addition d'eau. L'inhibition de croissance est déterminée après une incubation de 24 heures à 25°C à l'obscurité, par observation au microscope et mesure de l'augmentation de la DO_{600} . La valeur de la CMI correspond à un intervalle (a-b) de concentrations en peptide, où (a) représente la concentration la plus élevée à laquelle on observe une croissance, et (b) représente la concentration la plus faible qui induit 100% d'inhibition de croissance.

Activité anti-protozoaire :

Le protozoaire parasite des huîtres, *Perkinsus marinus* est cultivé en milieu DMEM (GIBCO), selon le protocole décrit par GAUTHIER et VASTA [J. Invertebr. Pathol., 66, 156-168, (1995)].

10 µM de peptide purifié sont additionnés à 4×10^4 *P. marinus*, dans de l'eau de mer (volume final 20 µl). Le mélange est incubé pendant 1 heure à température de la pièce. La viabilité des parasites est estimée par coloration à l'orange d'acridine et au bromure d'éthidium, comme décrit par MORVAN et al. [J. Invertebr. Pathol., 69, 177-82, (1997)]. La viabilité maximale est évaluée, à titre de contrôle positif, dans des échantillons dans lesquels le peptide n'a pas été ajouté.

Les résultats des différentes expérimentations effectuées, pour les peptides Myticine a et Myticine b sont illustrées par le Tableau 1 ci-dessous ; les activités biologiques sont exprimées en µM.

TABLEAU 1

	Myticine a	Myticine b
BACTERIES		
Gram-positif		
<i>Micrococcus luteus</i>	2,25-4,5	1-2
<i>Bacillus megaterium</i>	2,45-4,5	1-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	>20	>20
<i>Listeria monocytogenes</i>	>20	>20
<i>Aerococcus viridans</i>	4,5-9	2-4
<i>Enterococcus faecalis</i>	>20	N.D
Gram-négatif		
<i>Escherichia coli</i> D31	>20	10-20
<i>Salmonella newport</i>	>20	>20
<i>S. typhimurium</i>	>20	>20
<i>Brucella suis</i>	>20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	N.D
<i>Enteromonas aerogenes</i>	>20	N.D
<i>Vibrio alginolyticus</i>	>20	>20
<i>V. vulnificus</i>	>20	>20
<i>V. splendidus</i>	>20	>20
CHAMPIGNONS		
<i>Fusarium oxysporum</i>	>20	5-10
PROTOZOAIRE PARASITE D'HUITRES		
<i>Perkinsus marinus</i>	>20	>20

N.D : non déterminé

Ces résultats montrent que les 2 peptides sont actifs en particulier sur *Micrococcus luteus* ; le peptide Myticine b apparaît en outre plus actif que le peptide Myticine a sur *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, et *Fusarium oxysporum*.

EXEMPLE 3 : CLONAGE DES ADN_c DES PEPTIDES MYTICINE.

Une banque d'ADN_c a été construite dans le vecteur ZAP EXPRESS (STRATAGENE) à partir des ARN poly(A)⁺ totaux d'hémocytes de moules adultes. Une sonde d'ADN représentant 83 pb de l'ADN_c de la Myticine a a été construite en utilisant le kit de clonage PCR SCRIPT Amp (SK+) (STRATAGENE), et marquée par amorçage aléatoire en utilisant le kit de marquage d'ADN READY-TO-GO (PHARMACIA), et utilisée pour cribler la banque d'ADN transférée sur membranes HYBOND-N, (AMERSHAM). Des hybridations à stringence élevée ont été effectuées pendant une nuit à 65°C en solution de Denhardt 5X, 5X SSPE, 0,1 %SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon. Les

filtres préalablement rincés à 65°C en solution 0,5 X SSC contenant 0,1 % SDS, ont été autoradiographiés. Un criblage secondaire a été effectué pour purifier les clones positifs. Les phagemides ont été obtenus par
5 excision *in vivo* et leurs 2 brins ont été séquencés.

110 clones positifs ont été obtenus. Parmi ces clones, 4 ont été séquencés, et correspondent aux peptides Myticine a et Myticine B.

Dans les 2 cas, la séquence en acides aminés
10 déduite du cadre de lecture ouverte commence par un peptide signal de 20 acides aminés ; ce peptide-signal est directement suivi, à son extrémité C-terminale, par un peptide de 40 acides aminés, débutant par un résidu histidine, qui correspond à la forme active du peptide ;
15 ce peptide actif est suivi par une extension C-terminale de 36 acides aminés.

REVENDECATIONS

1) Peptide anti-microbien, dénommé myticine, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu à partir d'un mollusque bivalve, et en ce que

- 5 - sa masse moléculaire est d'environ 4,5 kDa ;
 - son pI est d'environ 8,7 ;
 - il comprend 8 résidus cystéine.

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (I) suivante :

HX₁HX₂CTSYX₃CX₄KFCGTAX₅CTX₆YX₇CRX₈LHX₉GKX₁₀CX₁₁CX₁₂HCSR (I)

dans laquelle : X₁= P ou S, X₂= V ou A, X₃= Y ou W, X₄= S ou G, X₅= S ou G, X₆= R ou H, X₇= G ou L, X₈= N ou V, X₉= R ou P, X₁₀= L ou M, X₁₁= F ou A, X₁₂= L ou H.

3) Peptide selon la revendication 2, choisi dans le groupe constitué par :

- un peptide comprenant la séquence (Ia) suivante :

HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRVLHPGKMCA CVHCSR (Ia)

- un peptide comprenant la séquence (Ib) suivante :

HPHVCTSY YCSKFCGTAGCTRYGCRNLHRGKLCFCLHCSR (Ib)

4) Acide nucléique comprenant une séquence codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 3.

5) Oligonucléotide comprenant un segment d'au moins 15 pb, et de préférence au moins 20 pb d'un acide nucléique selon la revendication 4.

6) Cassette d'expression, comprenant au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4, sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

7) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4.

8) Cellule procaryote ou eucaryote transformée par une séquence d'acide nucléique selon la revendication 4.

5 9) Procédé de production d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend l'expression d'un acide nucléique selon la revendication 4, dans au moins une cellule transformée selon la revendication 8.

10 10) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention d'un agent anti-microbien.

LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS

IFREMER

ROCH, Philippe

MITTA, Guillaume

HUBERT, Florence

NOEL, Thierry

<120> Peptides anti-microbiens de mollusques

<130> MJPCb644/43

<140>

<141>

<150> FR 9908858

<151> 1999-07-08

<160> 4

<210> 1

<211> 663

<212> ADN

<213> *Mytilus galloprovincialis*

<220>

<221> CDS

$\langle 222 \rangle$ (43) .. (330)

<220>

<221> mat peptide

 $\langle 222 \rangle \quad (10\bar{3}) \dots (222)$

<220>

<221> sig peptide

 $\langle 222 \rangle \quad (43) \dots (102)$

<400> 1

aaggataata ttttgattta actgcaaact caaacgtaca at atg aag gca aca 54
Met Lys Ala Thr
-20

atc ttg tta gca gtt cta gtg gca gtc ttt gtc gca ggt acg gaa gct 102
Ile Leu Leu Ala Val Leu Val Ala Val Phe Val Ala Gly Thr Glu Ala
-15 -10 -5 -1

cat tgc cac gct tgt aca tca tac tgg tgt ggt aag ttt tgt gga act 150
His Ser His Ala Cys Thr Ser Tyr Trp Cys Gly Lys Phe Cys Gly Thr
1 5 10 15

gct agt tgc aca cat tat cta tgc aga gta ctc cat ccc ggt aaa atg 198
Ala Ser Cys Thr His Tyr Leu Cys Arg Val Leu His Pro Gly Lys Met
20 25 30

tgc gca tgt gtt cat tgc agc agg gtg aac aat cct ttc aga gtt aat 246
Cys Ala Cys Val His Cys Ser Arg Val Asn Asn Pro Phe Arg Val Asn
35 40 45

caa gtt gct aaa agt att aac gat ttg gat tac act cca ata atg aag 294
 Gln Val Ala Lys Ser Ile Asn Asp Leu Asp Tyr Thr Pro Ile Met Lys
 50 55 60

tcg atg gaa aac ttg gac aat gga atg gat atg tta taagcaaaca 340
 Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu
 65 70 75

acttatgcaa tgcagatcac aactgtgaat ctttgctatc attctcactg cttttcacct 400
 ttcaacaaac gaaaaattat cagcaacttg aaaaataaca aacttgagtc atgtctgttc 460
 agtttccagt ctaatatatta tatcattata tgaaaggat aacaaaatta gtaccattgt 520
 gttctaatag aaacaattta taaacaagaa acattacact ttaagtataa attaacagga 580
 ttttgcctg cagctgtttt atctttcttt totcagctat agtcttctga ttgtaataaa 640
 atagcttgaa aaaaaaaaaa aaa 663

<210> 2
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> *Mytilus galloprovincialis*

<400> 2
 Met Lys Ala Thr Ile Leu Leu Ala Val Leu Val Ala Val Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Glu Ala His Ser His Ala Cys Thr Ser Tyr Trp Cys Gly Lys
 20 25 30
 Phe Cys Gly Thr Ala Ser Cys Thr His Tyr Leu Cys Arg Val Leu His
 35 40 45
 Pro Gly Lys Met Cys Ala Cys Val His Cys Ser Arg Val Asn Asn Pro
 50 55 60
 Phe Arg Val Asn Gln Val Ala Lys Ser Ile Asn Asp Leu Asp Tyr Thr
 65 70 75 80
 Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met Asp Met Leu
 85 90 95

<210> 3
 <211> 681
 <212> ADN
 <213> *Mytilus galloprovincialis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (13)..(300)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (73)..(192)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (13)..(72)

<400> 3

caaacgtaca ac atg aag gca aca atg ttg tta gca gtt gta gtg gct gtc 51
 Met Lys Ala Thr Met Leu Ala Val Val Val Ala Val
 -20 -15 -10

ttt gtc gca ggt aca gaa gct cat ccg cat gtt tgc aca tcg tac tac 99
 Phe Val Ala Gly Thr Glu Ala His Pro His Val Cys Thr Ser Tyr Tyr
 -5 -1 1 5

tgt agc aag ttt tgt ggg act gct ggt tgc aca cgt tat gga tgc cga 147
 Cys Ser Lys Phe Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Arg Tyr Gly Cys Arg
 10 15 20 25

aat ctc cat cgc ggg aag ctt tgc ttc tgt ctt cat tgc agc agg gtg 195
 Asn Leu His Arg Gly Lys Leu Cys Phe Cys Leu His Cys Ser Arg Val
 30 35 40

aag ttc ccg ttt gga gca act caa gat gct aaa agt atg aac gaa ctg 243
 Lys Phe Pro Phe Gly Ala Thr Gln Asp Ala Lys Ser Met Asn Glu Leu
 45 50 55

gaa tac act cca ata atg aag tcg atg gaa aat ttg gac aac gga atg 291
 Glu Tyr Thr Pro Ile Met Lys Ser Met Glu Asn Leu Asp Asn Gly Met
 60 65 70

gat atg tta taagcaaaact tatgacatga agatcacaaac tgtatacttt 340
 Asp Met Leu
 75

tgctattcct gtatccgctt tactcctttc ttcacacttt gtacggaatc cgtaacaga 400

aaattcatca tcaacttgaa aactaacaaa agatgtgtcg cacacgttac actcaccagt 460

ccataagtta tatcattaaa aaaagatgaa tcaagttacc gttaacgtgt gttcagatat 520

atctctgaca gaagaagtaa ctgttaacaa gaaatactgt tttccctcaa gttattaaaa 580

attagaagtc tccctgcaac tgttttatct ttccttactc agttcttttt tcatgttcta 640

ataaaacagt ttgaaatgaa caaaaaaaaaa a 681

<210> 4

<211> 96

<212> PRT

<213> Mytilus galloprovincialis

<400> 4

Met Lys Ala Thr Met Leu Leu Ala Val Val Val Ala Val Phe Val Ala
 1 5 10 15

Gly Thr Glu Ala His Pro His Val Cys Thr Ser Tyr Tyr Cys Ser Lys
 20 25 30

Phe Cys Gly Thr Ala Gly Cys Thr Arg Tyr Gly Cys Arg Asn Leu His
 35 40 45

Arg	Gly	Lys	Leu	Cys	Phe	Cys	Leu	His	Cys	Ser	Arg	Val	Lys	Phe	Pro
50						55					60				
Phe	Gly	Ala	Thr	Gln	Asp	Ala	Lys	Ser	Met	Asn	Glu	Leu	Glu	Tyr	Thr
65					70					75					80
Pro	Ile	Met	Lys	Ser	Met	Glu	Asn	Leu	Asp	Asn	Gly	Met	Asp	Met	Leu
				85					90					95	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: 31 Application No

PCT/FR 00/01975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/63 C07H21/00 A61K38/17
A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANEKO ET AL.: "Synechocystis sp. PCC6803 complete genome, 23/27, 2868767-3002965" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 October 1995 (1995-10-04), XP002132657 HEIDELBERG DE Ac D64004 the whole document & KANEKO ET AL.: DNA RES, vol. 2, 1995, pages 153-166, --- -/-	5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 October 2000

Date of mailing of the international search report

23/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, 0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01975

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHARLET ET AL.: "Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, <i>Mytilus edulis</i> " THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 36, 6 September 1996 (1996-09-06), pages 21808-21813, XP002132658 cited in the application abstract ----	1
A	EP 0 349 451 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 3 January 1990 (1990-01-03) abstract ----	1-3
P, X	MITTA ET AL.: "Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> " EUR J BIOCHEM, vol. 265, October 1999 (1999-10), pages 71-78, XP000952447 the whole document -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01975

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0349451 A	03-01-1990	FR 2633296 A	29-12-1989
		AT 86260 T	15-03-1993
		AU 620410 B	20-02-1992
		AU 3674889 A	04-01-1990
		DE 68905097 D	08-04-1993
		DE 68905097 T	09-09-1993
		DK 313089 A	25-12-1989
		JP 2045498 A	15-02-1990

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar tationale No

PCT/FR 00/01975

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/12 C07K14/435 C12N15/63 C07H21/00 A61K38/17
A61P31/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KANEKO ET AL.: "Synechocystis sp. PCC6803 complete genome, 23/27, 2868767-3002965" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 octobre 1995 (1995-10-04), XP002132657 HEIDELBERG DE Ac D64004 le document en entier & KANEKO ET AL.: DNA RES, vol. 2, 1995, pages 153-166, --- -/--	5

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ceder, 0

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 00/01975

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHARLET ET AL.: "Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, Mytilus edulis" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 36, 6 septembre 1996 (1996-09-06), pages 21808-21813, XP002132658 cité dans la demande abrégé ---	1
A	EP 0 349 451 A (CENTRE NAT RECH SCIENT) 3 janvier 1990 (1990-01-03) abrégé ---	1-3
P,X	MITTA ET AL.: "Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel Mytilus galloprovincialis" EUR J BIOCHEM, vol. 265, octobre 1999 (1999-10), pages 71-78, XP000952447 le document en entier -----	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au .embres de familles de brevets

Demar iternationale No

PCT/FR 00/01975

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0349451 A	03-01-1990	FR 2633296 A	29-12-1989
		AT 86260 T	15-03-1993
		AU 620410 B	20-02-1992
		AU 3674889 A	04-01-1990
		DE 68905097 D	08-04-1993
		DE 68905097 T	09-09-1993
		DK 313089 A	25-12-1989
		JP 2045498 A	15-02-1990
